



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년06월08일
(11) 등록번호 10-0961156
(24) 등록일자 2010년05월26일

(51) Int. Cl.
C12N 15/33 (2006.01) C12N 15/29 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0121960
(22) 출원일자 2007년11월28일
심사청구일자 2007년11월28일
(65) 공개번호 10-2009-0055178
(43) 공개일자 2009년06월02일
(56) 선행기술조사문헌
논문 1: J. Virol. Methods*
논문 2: Phytopathology
논문 3: J. Virol. Methods
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국생명공학연구원
대전 유성구 어은동 52번지
(72) 발명자
문계선
대전 유성구 도룡동 383-3번지 우성아파트 101동 401호
이수현
경기 화성시 태안읍 안녕리 성호 2차 아파트 102동 1002호
(뒤편에 계속)
(74) 대리인
최규환

전체 청구항 수 : 총 8 항

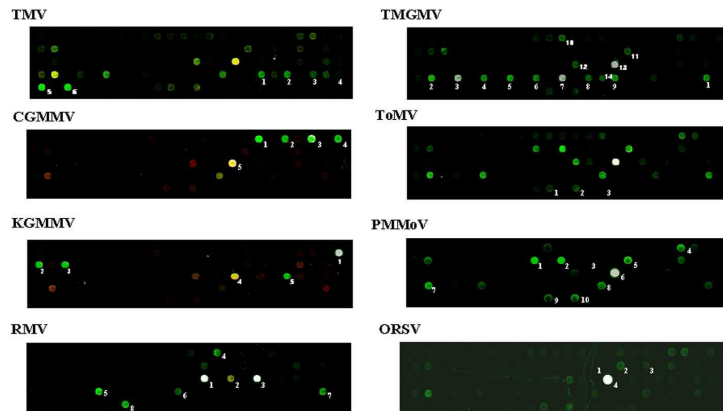
심사관 : 김정태

(54) 식물 바이러스를 검출하기 위한 프로브 세트, 마이크로어레이, 방법 및 키트

(57) 요약

본 발명은 30종의 식물 바이러스의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 특이적으로 혼성화하는 올리고뉴클레오티드 프로브 세트, 상기 프로브 세트가 고정화되어 있는 마이크로어레이, 상기 프로브 세트를 이용하여 30종의 식물 바이러스를 검출하기 위한 방법 및 상기 프로브 세트를 포함하는, 30종의 식물 바이러스를 검출하기 위한 키트를 제공한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김성욱

대전 유성구 도룡동 391번지 주공아파트 2동 302호

황인규

서울 관악구 신림동 서울대학교 농생명공학부 200
동 5124호

좌남수

경기 용인시 수지구 풍덕천2동 신정마을 현대프라
임아파트 208동1102호

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

서열번호 1 내지 115의 올리고뉴클레오티드 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드를 포함하는, AMV, BaYMV, BaMMV, BBWV2, CMV, CGMMV, KGMMV, MNSV, ORSV, OYDV, PRSV, PMMoV, PepMoV, PLRV, PVX, PVY, RBSDV, RSV, RMV, SLV, SMV, SqMV, SPFMV, TMGMV, TMV, TRV, ToMV, TuMV, WMV2 및 ZYMV의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브 세트.

청구항 4

제3항에 따른 올리고뉴클레오티드 프로브 세트가 고정화되어 있는 기판을 갖는 마이크로어레이.

청구항 5

핵산 시료를 제3항에 따른 올리고뉴클레오티드 프로브 세트와 접촉시켜 상기 핵산 시료와 프로브 서열을 혼성화시키는 단계; 및

상기 프로브와 핵산 시료 사이의 혼성화 정도를 검출하는 단계를 포함하는, AMV, BaYMV, BaMMV, BBWV2, CMV, CGMMV, KGMMV, MNSV, ORSV, OYDV, PRSV, PMMoV, PepMoV, PLRV, PVX, PVY, RBSDV, RSV, RMV, SLV, SMV, SqMV, SPFMV, TMGMV, TMV, TRV, ToMV, TuMV, WMV2 및 ZYMV로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 바이러스를 검출하기 위한 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 핵산 시료는 바이러스 RNA를 주형으로 하고, N-프라이머를 상기 주형에 어닐링시켜 제1가닥 (first strand) cDNA를 합성하는 단계를 포함하는, 핵산의 합성 방법에 의해 얻어진 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 N-프라이머의 길이는 5~50개 뉴클레오티드인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 핵산 시료는 검출가능한 표지 물질로 표지되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제5항에 있어서, 상기 프로브 세트는 마이크로어레이의 기판 상에 고정화되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제3항에 따른 올리고뉴클레오티드 프로브 세트; 및 혼성화 용액을 포함하는, AMV, BaYMV, BaMMV, BBWV2, CMV, CGMMV, KGMMV, MNSV, ORSV, OYDV, PRSV, PMMoV, PepMoV, PLRV, PVX, PVY, RBSDV, RSV, RMV, SLV, SMV, SqMV, SPFMV, TMGMV, TMV, TRV, ToMV, TuMV, WMV2 및 ZYMV로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 바이러스를 검출하기 위한 키트.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 식물 바이러스를 검출하기 위한 프로브 세트, 마이크로어레이, 방법 및 키트에 관한 것으로, 구체적으로는 30종의 식물 바이러스의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 특이적으로 혼성화하는 올리고뉴클레오티드 프로브 세트, 상기 프로브 세트가 고정화되어 있는 마이크로어레이, 상기 프로브 세트를 이용하여 30종의 식물 바이러스를 검출하기 위한 방법 및 상기 프로브 세트를 포함하는, 30종의 식물 바이러스를 검출하기 위한 키트에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 식물병이란 식물기주에 대한 병원균 또는 환경요인의 지속적인 영향의 결과로 나타난 기주세포와 조직의 기능이상으로서, 식물의 형태, 생리 등에 비정상적인 변화가 나타난 상태를 말하며, 그 결과 나타난 경제적 가치의 감소를 포함하기도 한다. 이러한 식물병을 일으키는 원인으로는 곰팡이(Fungi), 박테리아(Bacteria), 선충(Nematode), 마이코플라스마(Mycoplasma), 원생동물(Protozoa) 및 바이러스(Virus)가 있다.

[0003] 바이러스에 의하여 발생하는 식물병에 직접 작용하는 약제방제법은 현재까지 개발되어 있지 않은 실정이기 때문에, 바이러스에 의한 식물병을 관리하기 위해서는 먼저 식물체에 바이러스가 발생하였는지 여부와, 어떠한 바이러스가 발생하였는지 여부를 정밀하고 신속하게 진단하여야 한다. 그러나, 바이러스는 크기가 1 μ m 보다 작은 병원체로 광학현미경으로도 그 실체를 관찰할 수 없고, 전자현미경을 필요로 하기 때문에, 육안으로 식물체에 발생한 바이러스를 진단하는 것은 곤란하다. 이에 따라 바이러스를 진단하기 위한 다양한 방법들이 개발되어 사용되고 있다.

[0004] 지금까지 바이러스를 진단하기 위하여 ELISA와 같은 혈청학적 진단법이 많이 사용되어왔다. 그러나 혈청학적 진단법은 많은 시료를 일반적인 정밀도에서 진단하는데 사용하는 경우에는 큰 무리가 없었으나, 진단대상 바이러스와 혈청학적 유연관계가 있는 바이러스가 존재할 경우에는 식물체에 발생한 바이러스를 잘못 동정하게 된다거나, 바이러스에 감염된 식물체의 종류에 따라 기주유래 물질이 달라지면서, 이 물질과 비특이적 반응으로 인하여 바이러스를 잘못 진단하게 되는 문제가 발생하였다. 또한 2종 이상의 바이러스가 복합 감염된 경우에 이를 진단하기 위해서는 다른 종류의 항체를 사용해서 여러 번 진단해야 한다는 문제점이 있었다.

[0005] 이러한 진단법으로는 병의 원인균에 대한 자세한 정보를 얻기까지는 막대한 시간과 노동력의 투입이 요구된다. 따라서 적기에 병해충의 진단이 이루어지기 어려운 실정이다. 효율적인 병해충의 관리 및 국외에서 유입되는 검역 대상 병해충의 차단을 위해 유전자 칩의 개발은 매우 시급한 당면 과제이다.

[0006] DNA 칩은 올리고뉴클레오티드나 cDNA를 매우 작은 고정판에 고밀도로 집적한 것을 말하며, 이를 이용하여 수천 내지 수만개의 독립적인 유전자의 parallel한 유전자의 발현을 한꺼번에 분석하는 첨단 기법이다. 현재 DNA 칩은 인간을 포함한 여러 생물체의 게놈 수준에서 유전자 발현을 모니터링하는 중요한 도구로 이용되고 있으며 이를 응용해서 질환의 발생 가능성 예측 및 진단, 의약품 개발, 유전병의 진단 등에 널리 활용하려는 시도가 진행 중이다. 각 병원체를 특이적으로 검출할 수 있는 유전자 염기서열 정보를 확보해서 이를 이용하여 DNA 칩을 제작, 이용하면 병원체의 유무뿐만 아니라 병원체의 종류까지를 단시간에 손쉽게 파악할 수 있다.

[0007] 따라서 기존의 면역학적인 방법을 DNA 칩을 이용한 방법으로 대체할 경우, 병 발생 원인균을 손쉽게 검출할 수 있다. 이 기술을 확대 적용시키면 기존에 존재하는 종 이외에도 새롭게 나타나는 새로운 종의 출현을 신속하게 검출할 수 있고, 병해충의 지역별 분포, 검역대상 병해충진단, 역학조사 및 survey에 의한 질병 발생의 예측 등에 사용할 수 있다. 결론적으로 기초연구에 칩의 활용, 현장에서 효율적인 병 진단에 적용, 질병의 억제를 위한 정책의 수립을 위한 기초 데이터 제공 등으로 크게 활용될 수 있기 때문에 병해충의 진단을 위한 DNA 칩의 개발이 시급한 실정이다.

[0008] 한국특허등록 제10-0625010호에는 고추 및 파프리카에 발생하는 고추모틀바이러스, 잠두위조바이러스2, 오이모자이크바이러스 및 고추마일드모틀바이러스 진단용 프라이머 조합이 기재되어 있으나, 본 발명의 프로브에 대한 기재는 없다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0009] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 안출된 것으로서, 한국 주요 작물에 흔히 발생하며 경제적으로 많은 피해를

주고 있는 바이러스 30종을 특이적으로 진단할 수 있는 프로브 세트를 디자인하여 식물 병원성 바이러스를 효율적으로 검출하고자 한다.

과제 해결수단

- [0010] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 30종의 식물 바이러스의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 특이적으로 혼성화하는 올리고뉴클레오티드 프로브 세트를 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 상기 프로브 세트가 고정화되어 있는 마이크로어레이를 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 프로브 세트를 이용하여 30종의 식물 바이러스를 검출하기 위한 방법을 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 상기 프로브 세트를 포함하는, 30종의 식물 바이러스를 검출하기 위한 키트를 제공한다.

효 과

- [0014] 본 발명에 따르면, 본 발명의 프로브 세트는 하나의 칩에서 30종의 식물 병원성 바이러스를 효율적으로 검출할 수 있다. 또한, 하나의 칩으로 다중 진단이 가능하기 때문에 국내 농작물에 발생하는 바이러스 병 발생 양상을 모니터링 또는 조사에 투입하여 병 발생 예찰에 활용할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0015] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0016] 서열번호 1 내지 3으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열 내의 20개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, AMV(alfalfa mosaic virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0017] 서열번호 4 내지 6으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열 내의 20개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, BaYMV(Barley yellow mosaic virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0018] 서열번호 7 내지 9로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열 내의 20개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, BaMMV(Barley mild mosaic virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0019] 서열번호 10 내지 12로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열 내의 20개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, BBWV2(Broad bean wilt virus 2)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0020] 서열번호 13 내지 20으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열 내의 20개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, CMV(Cucumber mosaic virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0021] 서열번호 21 내지 23으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열 내의 20개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, CGMMV(Cucumber green mottle mosaic virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0022] 서열번호 24 내지 27로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열 내의 20개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, KGMMV(Kyuri green mottle mosaic virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0023] 서열번호 28 내지 31로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열 내의 20개 이상의 연속 뉴클레오티드의

절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드로 구성되는 균으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, MNSV(Melon necrotic spot virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;

- [0024] 서열번호 32 내지 34로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상의 서열 내의 20개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드로 구성되는 균으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, ORSV(Odontoglossum ringspot virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0025] 서열번호 35 내지 37로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상의 서열 내의 20개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드로 구성되는 균으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, OYDV(Onion yellow dwarf virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0026] 서열번호 38 내지 40으로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상의 서열 내의 20개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드로 구성되는 균으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, PRSV(Papaya ringspot virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0027] 서열번호 41 내지 44로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상의 서열 내의 20개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드로 구성되는 균으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, PMMoV(Pepper mild mottle virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0028] 서열번호 45 내지 49로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상의 서열 내의 20개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드로 구성되는 균으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, PepMoV(Pepper mottle virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0029] 서열번호 50 내지 52로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상의 서열 내의 20개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드로 구성되는 균으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, PLRV(Potato leaf roll virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0030] 서열번호 53 내지 55로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상의 서열 내의 20개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드로 구성되는 균으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, PVX(Potato virus X)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0031] 서열번호 56 내지 58로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상의 서열 내의 20개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드로 구성되는 균으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, PVY(Potato virus Y)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0032] 서열번호 59 내지 61로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상의 서열 내의 20개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드로 구성되는 균으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, RBSDV(Rice black-streaked dwarf virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0033] 서열번호 62 내지 66으로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상의 서열 내의 20개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드로 구성되는 균으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, RSV(Rice stripe virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0034] 서열번호 67 내지 70으로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상의 서열 내의 20개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드로 구성되는 균으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, RMV(Ribgrass mosaic virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할

수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;

- [0035] 서열번호 71 내지 74로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열 내의 20개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, SLV(Shallot latent virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0036] 서열번호 75 내지 77로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열 내의 20개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, SMV(Soybean mosaic virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0037] 서열번호 78 내지 80으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열 내의 20개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, SqMV(Squash mosaic virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0038] 서열번호 81 내지 83으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열 내의 20개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, SPFMV(Sweet potato feathery mottle virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0039] 서열번호 84 내지 92로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열 내의 20개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, TMGMV(Tobacco mild green mosaic virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0040] 서열번호 93 내지 98로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열 내의 20개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, TMV(Tobacco mosaic virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0041] 서열번호 99 내지 101로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열 내의 20개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, TRV(Tobacco rattle virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0042] 서열번호 102 내지 105로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열 내의 20개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, ToMV(Tomato mosaic virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0043] 서열번호 106 내지 108로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열 내의 20개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, TuMV(Turnip mosaic virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0044] 서열번호 109 내지 111로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열 내의 20개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, WMV2(Watermelon mosaic virus 2)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브; 및
- [0045] 서열번호 112 내지 115로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열 내의 20개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, ZYMV(Zucchini yellow mosaic virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0046] 로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 프로브 또는 올리고뉴클레오티드 프로브 세트

를 포함하는, AMV, BaYMV, BaMMV, BBWV2, CMV, CGMMV, KGMMV, MNSV, ORSV, OYDV, PRSV, PMMoV, PepMoV, PLRV, PVX, PVY, RBSDV, RSV, RMV, SLV, SMV, SqMV, SPFMV, TMGMV, TMV, TRV, ToMV, TuMV, WMV2 및 ZYMV로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 바이러스의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브 세트를 제공한다.

- [0047] 바람직하게는, 본 발명의 일 구현예에 따른 올리고뉴클레오티드 프로브 세트는 서열번호 1 내지 3의 올리고뉴클레오티드 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드를 포함하는, AMV(alfalfa mosaic virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0048] 서열번호 4 내지 6의 올리고뉴클레오티드 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드를 포함하는, BaYMV(Barley yellow mosaic virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0049] 서열번호 7 내지 9의 올리고뉴클레오티드 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드를 포함하는, BaMMV(Barley mild mosaic virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0050] 서열번호 10 내지 12의 올리고뉴클레오티드 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드를 포함하는, BBWV2(Broad bean wilt virus 2)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0051] 서열번호 13 내지 20의 올리고뉴클레오티드 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드를 포함하는, CMV(Cucumber mosaic virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0052] 서열번호 21 내지 23의 올리고뉴클레오티드 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드를 포함하는, CGMMV(Cucumber green mottle mosaic virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0053] 서열번호 24 내지 27의 올리고뉴클레오티드 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드를 포함하는, KGMMV(Kyuri green mottle mosaic virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0054] 서열번호 28 내지 31의 올리고뉴클레오티드 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드를 포함하는, MNSV(Melon necrotic spot virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0055] 서열번호 32 내지 34의 올리고뉴클레오티드 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드를 포함하는, ORSV(Odontoglossum ringspot virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0056] 서열번호 35 내지 37의 올리고뉴클레오티드 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드를 포함하는, OYDV(Onion yellow dwarf virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0057] 서열번호 38 내지 40의 올리고뉴클레오티드 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드를 포함하는, PRSV(Papaya ringspot virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0058] 서열번호 41 내지 44의 올리고뉴클레오티드 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드를 포함하는, PMMoV(Pepper mild mottle virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0059] 서열번호 45 내지 49의 올리고뉴클레오티드 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드를 포함하는, PepMoV(Pepper mottle virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0060] 서열번호 50 내지 52의 올리고뉴클레오티드 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드를 포함하는, PLRV(Potato leaf roll virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0061] 서열번호 53 내지 55의 올리고뉴클레오티드 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드를 포함하는, PVX(Potato virus X)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0062] 서열번호 56 내지 58의 올리고뉴클레오티드 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드를 포함하는, PVY(Potato virus Y)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0063] 서열번호 59 내지 61의 올리고뉴클레오티드 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드를 포함하는, RBSDV(Rice black-streaked dwarf virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0064] 서열번호 62 내지 66의 올리고뉴클레오티드 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드를 포함하는, RSV(Rice stripe virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0065] 서열번호 67 내지 70의 올리고뉴클레오티드 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드를 포함하는, RMV(Ribgrass

mosaic virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;

- [0066] 서열번호 71 내지 74의 올리고뉴클레오티드 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드를 포함하는, SLV(Shallot latent virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0067] 서열번호 75 내지 77의 올리고뉴클레오티드 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드를 포함하는, SMV(Soybean mosaic virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0068] 서열번호 78 내지 80의 올리고뉴클레오티드 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드를 포함하는, SqMV(Squash mosaic virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0069] 서열번호 81 내지 83의 올리고뉴클레오티드 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드를 포함하는, SPFMV(Sweet potato feathery mottle virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0070] 서열번호 84 내지 92의 올리고뉴클레오티드 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드를 포함하는, TMGMV(Tobacco mild green mosaic virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0071] 서열번호 93 내지 98의 올리고뉴클레오티드 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드를 포함하는, TMV(Tobacco mosaic virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0072] 서열번호 99 내지 101의 올리고뉴클레오티드 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드를 포함하는, TRV(Tobacco rattle virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0073] 서열번호 102 내지 105의 올리고뉴클레오티드 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드를 포함하는, ToMV(Tomato mosaic virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0074] 서열번호 106 내지 108의 올리고뉴클레오티드 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드를 포함하는, TuMV(Turnip mosaic virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0075] 서열번호 109 내지 111의 올리고뉴클레오티드 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드를 포함하는, WMV2(Watermelon mosaic virus 2)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브; 및
- [0076] 서열번호 112 내지 115의 올리고뉴클레오티드 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드를 포함하는, ZYMV(Zucchini yellow mosaic virus)의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브;
- [0077] 로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 프로브 세트를 포함하는, AMV, BaYMV, BaMMV, BBWV2, CMV, CGMMV, KGMMV, MNSV, ORSV, OYDV, PRSV, PMMoV, PepMoV, PLRV, PVX, PVY, RBSDV, RSV, RMV, SLV, SMV, SqMV, SPFMV, TMGMV, TMV, TRV, ToMV, TuMV, WMV2 및 ZYMV로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 바이러스의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브 세트이다.
- [0078] 더욱 바람직하게는 본 발명의 올리고뉴클레오티드 프로브 세트는 서열번호 1 내지 115의 올리고뉴클레오티드 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드를 포함하는, AMV, BaYMV, BaMMV, BBWV2, CMV, CGMMV, KGMMV, MNSV, ORSV, OYDV, PRSV, PMMoV, PepMoV, PLRV, PVX, PVY, RBSDV, RSV, RMV, SLV, SMV, SqMV, SPFMV, TMGMV, TMV, TRV, ToMV, TuMV, WMV2 및 ZYMV의 게놈 RNA 또는 그의 cDNA에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브 세트이다. 서열번호 1 내지 115의 올리고뉴클레오티드 및 그의 상보적 올리고뉴클레오티드 전체를 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브 세트는 더욱 효율적으로 30종의 바이러스를 검출할 수 있다.
- [0079] 본 명세서에 있어서, "프로브"란 상보적인 단일가닥 표적 서열과 혼성화하여 이중가닥 분자 (혼성체)를 형성하는 단일가닥 핵산 서열을 말한다.
- [0080] 본 명세서에 있어서, 프로브로서 이용된 올리고뉴클레오티드는 또한 뉴클레오티드 유사체(analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)를 포함할 수 있다.
- [0081] 본 발명의 바이러스 진단용 올리고 칩의 진단대상 바이러스 병은 우리나라 주요 작물에 흔히 발생하며 경제적으로 많은 피해를 주고 있는 바이러스를 위주로 하여 30종을 선정하였다. 각 작물별 바이러스병 발생상태는 한국 식물병리학회에서 발간된 병목록, 농촌진흥청에서 출간된 각종 도감, 최근 한국식물병리학회 등에서 발표된 논문 및 포스터, 그리고 전국적인 병 발생조사와 진단관련 민원시료들로부터 얻어진 자료를 종합하여 분석되었다. 선발된 30종의 바이러스 및 자연기주는 하기 표 1과 같다.

[0082] 표 1. 30종의 식물 병원성 바이러스 및 바이러스의 자연기주

[0083]

번호	진단 대상 바이러스	기주
1	Alfalfa mosaic virus (AMV)	콩
2	Barley yellow mosaic virus (BaYMV)	보리
3	Barley mild mosaic virus (BaMMV)	보리
4	Broad bean wilt virus 2 (BBWV2)	고추
5	Cucumber mosaic virus (CMV)	고추
6	Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)	수박
7	Kyuri green mottle mosaic virus (KGMMV)	오이
8	Melon necrotic spot virus (MNSV)	메론
9	Odontoglossum ringspot virus (ORSV)	난
10	Onion yellow dwarf virus (OYDV)	마늘
11	Papaya ringspot virus (PRSV)	호박
12	Pepper mild mottle virus (PMMoV)	고추
13	Pepper mottle virus (PepMoV)	고추
14	Potato leaf roll virus (PLRV)	감자
15	Potato virus X (PVX)	감자
16	Potato virus Y (PVY)	감자
17	Rice black-streaked dwarf virus (RBSDV)	벼
18	Rice stripe virus (RSV)	벼
19	Ribgrass mosaic virus (RMV)	배추
20	Shallot latent virus (SLV)	마늘
21	Soybean mosaic virus (SMV)	콩
22	Squash mosaic virus (SqMV)	호박
23	Sweet potato feathery mottle virus (SPFMV)	고구마
24	Tobacco mild green mosaic virus (TMGMV)	고추
25	Tobacco mosaic virus (TMV)	담배
26	Tobacco rattle virus (TRV)	감자
27	Tomato mosaic virus (ToMV)	토마토
28	Turnip mosaic virus (TuMV)	배추
29	Watermelon mosaic virus 2 (WMV2)	호박
30	Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)	호박

[0084] 본 발명의 30종의 바이러스에 특이적으로 혼성화할 수 있는 프로브 세트를 디자인하였으며, 이의 서열은 하기 표 2와 같다.

[0085] 표 2. 30종의 바이러스에 특이적인 프로브 서열

Target virus		Sequence	서열번호
Alfalfa mosaic alfamovirus 7	AMV 1	GCCTTTGTTTGGACTTCGACGCTCTGCCTGAGGATCTAAGAAT	1
Alfalfa mosaic alfamovirus	AMV 2	ATGCTTTAAATGCTGGGAATTTGACGGAATTTGTTCTTGATAGGAC	2
Alfalfa mosaic alfamovirus	AMV 3	CTCATCAGAGTATGTTCCCGAGTATTCGTTGAAGAGATTTCCAA	3
Barley yellow mosaic bymovirus 2	BaYMV 1	AATGGTCTTCGTGATGCGCAGGGAGTCCGTAAGTTCACCAATC	4
Barley yellow mosaic bymovirus	BaYMV 2	CATTAAGCAAGCAGTATCAGAGCCAAACATACTTCCCAAC	5
Barley yellow mosaic bymovirus	BaYMV 3	ACATAATTGAGACAGGTGTTACTCTTAGCGTTGATGTGTTGTGATT	6
Barley mild mosaic bymovirus	BaMMV 1	GATACTCAAGGACTACACGCACCGCAACACTGATCTGATAGGAAC	7
Barley mild mosaic bymovirus	BaMMV 2	CTACAACCCAATACAAACACGAAACAATAAACAACAACACACA	8
Barley mild mosaic bymovirus	BaMMV 3	CAACACCTGCTCTTGAACAATCAACGGACTTCACAACAATCTTC	9
Broad bean wilt 2 fabavirus	BEWV2 1	CAATGGATGAAGTACACTTGGACACTGCTATCAATGGCTTGGAAAGTGT	10
Broad bean wilt 2 fabavirus	BEWV2 2	GC9GAATTGGATTGGCAGTGAGTTTATGTTGAGGAAATGAGAGTG	11
Broad bean wilt 2 fabavirus	BEWV2 3	CGTCCGAACTTGTGCGAGTGTGGATAGATACTTACAGAGATCA	12
Cucumber mosaic cucumovirus R3 03(박과)	CMV 1	CATAACCATGATCTTCCCGCTTGTAGTGTCTTTCCAACCGAGTATGATTG	13
Cucumber mosaic cucumovirus R3 04(박과)	CMV 2	AAGCTTAACCAACCACTTTGTAGGGAGTGAACGCTGTAAACCTGGGT	14
Cucumber mosaic cucumovirus R3 05(박과)	CMV 3	GAGTCGAGTCATGGACAAATCTGAATCAACGAGTGTGGTCGTACCGTTC	15
Cucumber mosaic cucumovirus R3 06(박과)	CMV 4	GATGCGGCTGATAATGGCAGCATGAGAAAGTACGCGCTCCTCGTGTATT	16
Cucumber mosaic cucumovirus (박과)	CMV 5	ATTTGATTCTACCGTGTGGGTGACAGTCCGTAAGTTCTGCCTCCTCGG	17
Cucumber mosaic cucumovirus 10(박과)	CMV 6	ATGCTCCAGTTTGAAGTCTGTTTCCAGGATCTCCCTCCGTT	18
Cucumber mosaic cucumovirus 2(박과)	CMV 7	TGCGTTTCGTTCTTGGATCTTTAGAGAGTCTGTGTTGTGTTTC	19
Cucumber mosaic cucumovirus 4	CMV 8	GAGTTCAGGGTTGAGCGTGTAAATTCACAAACAACGGAAGAAT	20
Cucumber green mottle mosaic tobamovirus 6	CGMMV 1	GGGATAAAGACGCTCATTACTATCAACGGAAGTCTGGTGATGTA	21
Cucumber green mottle mosaic tobamovirus 9	CGMMV 2	AACCTCCAAATCGGAGGTTGGACTCTGCTTCTGAGAGTCCAAT	22
Cucumber green mottle mosaic tobamovirus	CGMMV 3	GGATGTAACCTGAAGATATGGAGGATATAGTGTGATGGCGACAAAGAT	23
Kyuri green mottle mosaic tobamovirus 10	KGMMV 1	TTGAACCCCTTCTCGACTCAGTTCOAATTCAGCGGCTGTCATCG	24
Kyuri green mottle mosaic tobamovirus 2	KGMMV 2	AGTGGTTGTTGAGGCTCTTTTTCGGAAGTCTTCTGTCTAGATAT	25
Kyuri green mottle mosaic tobamovirus 1	KGMMV 3	ATTTGAGGCTAAGTTGTTTAAAGAAAGGATGAGGACTTTTGTG	26
Kyuri green mottle mosaic tobamovirus 3	KGMMV 4	CTGTTGAGATGTTAATCTGGGAAGATGGGTTTACGACGATTC	27
Melon necrotic spot carmovirus	MNSV 1	CTGCCATTAGCTCTTATGCTCATACGCTGATTACGCGCTTGGGCTGAG	28
Melon necrotic spot carmovirus	MNSV 2	GAAATCGTTGAGGGGTTAAGTGTTCACGAGGAGGATCCGCTATCTGAAAA	29
Melon necrotic spot carmovirus 10	MNSV 3	TGTGCAATCAAGATCCCGAGCAATTGCTGGAAATGTTGTAT	30

[0086]

Melon necrotic spot carmovirus 9	MNSV 4	TGATTCAACGCCTTGGCAGAGAACGTTTTAGTGGTTCCTGTGTA	31
Odontoglossum ringspot tobamovirus	ORSV 1	CTCAAAGTGACAAAAGCCGAACTGAAGGAGCGTGTATGAAAG	32
Odontoglossum ringspot tobamovirus	ORSV 2	TGGTATGATGATGTTGGTATTAGTGTGATGATATGTTGGTCCGT	33
Odontoglossum ringspot tobamovirus	ORSV 3	GCCACACTTTTACACTGTAGGGAGGTTAGGAGTTTACTTAGA	34
Onion yellow dwarf potyvirus	OYDV 1	GCCTTCAAACAATCGCAAACACACACACTCAAAACGCAATTCAC	35
Onion yellow dwarf potyvirus 10	OYDV 2	TGCTATGATTCGCGACGGACTCTGACAAAGTACGAAAGATTA	36
Onion yellow dwarf potyvirus 9	OYDV 3	TATTAAGGATTGTTGAGAGGTTTACAGTTTGAAGCATGACATG	37
Papaya ringspot potyvirus 8	PRSV 1	TGAGGTTGGAATTAAGGCGTTATACACTAGTAAGCGTGGTCAAT	38
Papaya ringspot potyvirus 9	PRSV 2	TTGAGGGGCTTATACACTAGTAAGCGTGGTCAATGATGATG	39
Papaya ringspot potyvirus 10	PRSV 3	TTTGAATACAGTGTGGCTGTGCCACGCTCTCTATTTATAGTGA	40
Pepper mild mottle tobamovirus	PMMoV 1	TGAACGATCTTGCTAATCGAGACTGTACGAAATCAGCGGTCGAACAATGC	41
Pepper mild mottle tobamovirus 2	PMMoV 2	ACTCGAGTCAATCGACGCGAGTCTTCTCGTTTAACTATGGC	42
Pepper mild mottle tobamovirus 4	PMMoV 3	CGGGAATGTACAATCAAGCTCTGTTCGAGAGCGGAGTGGACTCA	43
Pepper mild mottle tobamovirus 3	PMMoV 4	CCTTATACATGATGGTGTAAATTAATTTGACGAAACGTTATACGTC	44
Pepper mottle potyvirus	PepMoV 1	AATTTCAGAGAACCTGGTCAACAGATAGAGTGTGCTCATTGGATCAAC	45
Pepper mottle potyvirus	PepMoV 2	TGCGTATTGCTGTTATTCGATTAAAGTGAAGTTCAATTCATACA	46
Pepper mottle potyvirus 3	PepMoV 3	CACGATTTGTATGCAATTCACGTAATTTAGCAGTTGTGAAAG	47
Pepper mottle potyvirus 5	PepMoV 4	AACAGGTGGAATTCCTATTAAGCCCGTGTATAGAGAAATGCTAAGC	48
Pepper mottle potyvirus 8	PepMoV 5	GAACTTCAGGCTACCTCAGATATTTCCGCTGAGCGGATGAAGAG	49
Potato leaf roll polerovirus	PLRV 1	TGGTCTTCAAAGAACTGCTTGGTGTGCTTAAAGGCTTCCACTGGAAGA	50
Potato leaf roll polerovirus	PLRV 2	TTTTGTCAGAAATGCTATTTCGCTCCGTAACCTCCGTTGAAAGAAATCCC	51
Potato leaf roll polerovirus 10	PLRV 3	GCATTGGAAGTTCAAGCCGCTGTACATCAACCGGACAAAATAGAT	52
Potato potexvirus X 10	PVX 1	TCTCAAGCGCTCTCCGGTGAACGGTTAAGTTTCCATTGATACTC	53
Potato potexvirus X 7	PVX 2	GCCGATCTCAAGCCACTCCGTTGAAACGGTTAAGTTTCCATTGA	54
Potato potexvirus X	PVX 3	GGCTGTTGCTACTCTACCACCAACATTAACCTACATTAACCG	55
Potato potyvirus Y 4	PVY 1	ACTTGAGTGCATACTTAAAGTGCACCACTAAGGAAATGACAC	56
Potato potyvirus Y 8	PVY 2	GATAAGTGGACTGTATGTGCTGAAAGCATCTCGCAAGGACGGAC	57
Potato potyvirus Y	PVY 3	GATAAGTGGACTGTATGTGCTGAAAGCATCTCGCAAGGACGGAC	58
Rice black-streaked dwarf fliivirus	RBSDV 1	AAGATGTATGGGATCTCCACTTCCAGCAACATTCAGTAAAGACG	59

[0087]

Rice black-streaked dwarf fijiivirus 4	RBSDV 2	ATCTT TAGGT GCTT CATT TGAT GTCGATGCTGCAATTGAATTCGG	60
Rice black-streaked dwarf fijiivirus 7	RBSDV 3	GCTTGATTGATGTCGATGCTGCAATTGAATTCGGTGCATGTT	61
Rice stripe tenuivirus 1	RSV 1	AAACATCGTAATCTAAAAACCCACACTCCACTGGCTGTCTAGTGG	62
Rice stripe tenuivirus 4	RSV 2	GTACAGCCTTGTCTGATTCCCATAAAGTGTGATCGTATTGACAGA	63
Rice stripe tenuivirus 5	RSV 3	GTGAGACATTAGGGAATGTTGAGCCAGCTTTCCAAGTGTGATAG	64
Rice stripe tenuivirus 8	RSV 4	TCTCACACCCTCATGCGAGACATTTGGGAATAGCTGAGCCAACCT	65
Rice stripe tenuivirus 9	RSV 5	TCTGTGAGCCAAGTACAGCTTGGTCTGGTTCCTCATGTACTGA	66
Ribgrass mosaic tobamovirus 03	RMV 1	AGTCTGAGTCCCTGTGTGATATTGATTTGTAGTGAATGTGCCATTAGAT	67
Ribgrass mosaic tobamovirus	RMV 2	TGCGAAGTGTGGTGGCGATTATGAATAGTGAATGACGTTCACCGTCA	68
Ribgrass mosaic tobamovirus	RMV 3	AGTCTGAGTCCCTGTGTGATATTGATTTGTAGTGAATGTGCCATTAGAT	69
Ribgrass mosaic tobamovirus	RMV 4	GTTCAATGTGACCGACCTTTTCAGCAAGTGTGAGCTAAGCACCGTTAACGG	70
Shallot latent carlavirus	SLV 1	ATATTATGGCTAAGGAAGCAGAAAGAACTCAAGTAAAGTTCGCGACTCGC	71
Shallot latent carlavirus	SLV 2	TGTTCTGGGACATCTGTAATGATTTGTGCCACTGCTGGTAGTCTC	72
Shallot latent carlavirus 4	SLV 3	CTTCTGAATGCAAGTGGTGGACCGCTTTGAGTCTGTTCTCTAGAA	73
Shallot latent carlavirus 6	SLV 4	GCATGAATAAATGGTGTCTATGAGTTCGAAGTTAAAGGTCCTGATC	74
Soybean mosaic potyvirus	SMV 1	TGATTTCACAATGAACAATGTGGTGAATTGGCAGCGCAATAAGCCAGT	75
Soybean mosaic potyvirus 7	SMV 2	AGCACCAGCAGTAGCAAAAGAGCTGGTATAAGCAGCAAAAGTGA	76
Soybean mosaic potyvirus	SMV 3	AGGAAGCAGAAGGGTAGCACTCGCAAAAAGGGAAGGGTCCGAAAGTCG	77
Squash mosaic comovirus 10	SqMV 1	GCCACTTACAGACTTGGCTCTAGTGTGCATATCGATAG	78
Squash mosaic comovirus 2	SqMV 2	GGTATCATAAGTTGGTTACCTCAGTATTGTGATGTTAGATAAG	79
Squash mosaic comovirus	SqMV 3	GCTTTCATAGTTGTTTCGTTGTTGTTTCCTTCTTCTGGGTTTGT	80
Sweet potato feathery mottle potyvirus 1	SPFMV 1	AATGTGGCCCGTGGTACATTCGTTGTGCCAGTGTCAAGATG	81
Sweet potato feathery mottle potyvirus 2	SPFMV 2	AGTATGAAGTGGCAACACCGTTCCACCCCAAGAAATTCCTCAAG	82
Sweet potato feathery mottle potyvirus	SPFMV 3	CGCAAGAAAGATACGGAGAGGACAGCAACTGATGTTACTA	83
Tobacco mild green mosaic tobamovirus 04	TMGMV 1	ACAAAACAACAACAACAACAATGGCACACATACAATACAATAGCAAC	84
Tobacco mild green mosaic tobamovirus	TMGMV 2	TTATGAAGGAGATAGAATGGTACTGAGAGCGACTGGAGGAGGTGGCTG	85
Tobacco mild green mosaic tobamovirus	TMGMV 3	GCTGGAGTGTGACGAAGGATCAATGATGAGATGGTGGGAAACAGGA	86
Tobacco mild green mosaic tobamovirus	TMGMV 4	ACAAAACAACAACAACAACAATGGCACACATACAATACAATAGCAAC	87
Tobacco mild green mosaic tobamovirus 5	TMGMV 5	GTCTATCGCGTCAATGAGTACGTTTAAATCAACATGCCTATACA	88
Tobacco mild green mosaic tobamovirus 6	TMGMV 6	GTTACTGGTAAATGAATAAGGCGCAACTTTCAAAAGAGAGGATGAT	89
Tobacco mild green mosaic tobamovirus 7	TMGMV 7	TAAGAGAAATTTCAACGACACGACCTGACGGGACGATTGACAT	90

Tobacco mild green mosaic tobamovirus 8	TMGMV 8	TACGCTTAATGAAATAGGCGCAACTTCAAAGAGAAAGGTGATGA	91
Tobacco mild green mosaic tobamovirus 9	TMGMV 9	TTTGAGGGTCTATACCAGCAAAAAGATGGTAAGGAGTGAAGTGC	92
Tobacco mosaic tobamovirus 1	TMV 1	AAATAATGGTTCATGAGAATGAGTCAATTTGTGAGAGGTGAACCTTC	93
Tobacco mosaic tobamovirus 10	TMV 2	TTAGACCCGCTAGT CACAGCAGTGTAGGTGCATTGCACACTAGA	94
Tobacco mosaic tobamovirus 3	TMV 3	CGCAGGCGCCTCTCGGATCTTACTACACAGCAGCTGCAAG	95
Tobacco mosaic tobamovirus 7	TMV 4	TACATTCGCGTATTAGAGCCTCTAGT TACTCGACTATTAGCGCT	96
Tobacco mosaic tobamovirus 8	TMV 5	TCAATGAGATGAGT CATTGTCAAGGTAAACCTTCAAAGGAGT	97
Tobacco mosaic tobamovirus 9	TMV 6	TGGAAAGAGCAGACGAAGCTAGCTTGGATCCTATACACAGCTG	98
Tobacco rattle tobavirus 1	TRV 1	GAAACAGATTGAACGAGTTCGAGCTGAAAAGGCATTTACTACGGT	99
Tobacco rattle tobavirus 5	TRV 2	GACGTTGCTACGGTTAAAAGTCCGAAATTCGAAACCCCTCTAA	100
Tobacco rattle tobavirus 6	TRV 3	CAATTGCGATTAGACAATGTTAGCATCAAAGTGGAACTGGAA	101
Tomato mosaic tobamovirus	ToMV 1	GAAAGTAGTCTGGTGTCTGT TTTT AGTTGGTCTTGTGTCC	102
Tomato mosaic tobamovirus	ToMV 2	TTTGAAGTAGTCTGGTGTCTGT TTTT AGTTGGTCTTGTGTCT	103
Tomato mosaic tobamovirus 3	ToMV 3	CAGATTTCTTGGCGATGTTATAGGTGTACAGGT TACTAGGAAT	104
Tomato mosaic tobamovirus 5	ToMV 4	GTTTCCCTCAGAGCACCGTCAAGATTTCTGTGATGTTTATAAGGT	105
Turnip mosaic potyvirus	TuMV 1	CAACACGCTCATGTCAT ACTGGCAGTCAACTATTCACTCAAGAAAAGTG	106
Turnip mosaic potyvirus	TuMV 2	CGCGACGAGCTAAAGT TGAATAGACGTTAGCCTCAGTGAAGCCGACG	107
Turnip mosaic potyvirus 9	TuMV 3	CCTAGGCTCAAAGCCTAACGAAATGCGAGT GCCAAAATAC	108
Watermelon mosaic 2 potyvirus 5	WMV2 1	GAAAGTGCCCTTAT TTTGCGCAATATCTCTCACTGCATGATGGAG	109
Watermelon mosaic 2 potyvirus 7	WMV2 2	TGGTTGACTTGAATTCGAGAAATGCTTATTGTGACTGATCCTG	110
Watermelon mosaic 2 potyvirus	WMV2 3	GGACGCGAGGAAAGAAATCAAGAAAGAAACCAAGTACAAAGGGAAT	111
Zucchini yellow mosaic potyvirus	ZYMV 1	TGATGATCTCACATGGACTCAACATTTGGCTATGGCAACCTAGTAAAAATCG	112
Zucchini yellow mosaic potyvirus	ZYMV 2	TTGACTACAACAACGAGGAAATGTGGT GAGT TAGCAGCAACCTTTGT CAG	113
Zucchini yellow mosaic potyvirus	ZYMV 3	CCAGCATCTGAGGCGAGAACGCAATGATATAGCAAAAGGAAAGTTATTGCTA	114
Zucchini yellow mosaic potyvirus 7	ZYMV 4	CGCCTCTGGTCAACCAAGTTCAACAGAAATACGATCTGAATGA	115

[0088]

[0089]

[0090]

[0091]

[0092]

본 발명은 또한, 본 발명에 따른 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 프로브 세트가 고정화되어 있는 기판을 갖는 마이크로어레이를 제공한다.

본 발명의 마이크로어레이에 있어서, "마이크로어레이"란 기관 상에 올리고뉴클레오티드의 그룹이 높은 밀도로 고정화되어 있는 것으로서, 상기 올리고뉴클레오티드 그룹은 각각 일정한 영역에 고정화되어 있는 마이크로어레이를 의미한다. 마이크로어레이는 칩과 상호 교환하여 사용할 수 있다. 이러한 마이크로어레이는 당업계에 잘 알려져 있다. 마이크로어레이에 관하여는 예를 들면, 미국특허 제5,445,934호 및 제5,744,305호에 개시되어 있으며, 이들 특허의 내용은 참조에 의하여 본 명세서에 포함되어진다. 상기 올리고뉴클레오티드 프로브 세트에 대하여는 상기 기재한 바와 같다.

용어 "기관"은 혼성화 특성을 보유하고, 혼성화의 배경 수준이 낮게 유지되는 조건하에 올리고뉴클레오티드 프로브가 커플링될 수 있는 임의의 기판을 말한다. 통상적으로, 상기 기관은 미세역가(microtiter) 플레이트, 막(예를 들면, 나일론 또는 니트로셀룰로오스) 또는 미세구(비드) 또는 칩일 수 있다. 막에 적용 또는 고정

전에, 핵산 프로브를 변형시켜 고정화를 촉진시키거나 혼성화 효율을 개선시킬 수 있다. 상기 변형은 단독중합체 테일링(homopolymer tailing), 지방족기, NH₂ 기, SH 기 및 카르복실기와 같은 상이한 반응성 작용기와의 커플링, 또는 바이오틴, 합텐 또는 단백질과의 커플링을 포함할 수 있다.

- [0093] 본 발명은 또한, 핵산 시료를 본 발명에 따른 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 프로브 세트와 접촉시켜 상기 핵산 시료와 프로브 서열을 혼성화시키는 단계; 및
- [0094] 상기 프로브와 핵산 시료 사이의 혼성화 정도를 검출하는 단계를 포함하는, AMV, BaYMV, BaMMV, BBWV2, CMV, CGMMV, KGMV, MNSV, ORSV, OYDV, PRSV, PMMoV, PepMoV, PLRV, PVX, PVY, RBSDV, RSV, RMV, SLV, SMV, SqMV, SPFMV, TMGMV, TMV, TRV, ToMV, TuMV, WMV2 및 ZYMV로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 바이러스를 검출하기 위한 방법을 제공한다.
- [0095] 본 발명의 방법은 핵산 시료를 본 발명에 따른 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 프로브 세트와 접촉시켜 상기 핵산 시료와 프로브 서열을 혼성화시키는 단계를 포함하는데, 상기 핵산 시료는 바이러스 RNA를 주형으로 하고, N-프라이머를 상기 주형에 어닐링시켜 제1가닥 (first strand) cDNA를 합성하는 단계를 포함하는, 핵산의 합성 방법에 의해 얻어질 수 있다.
- [0096] 본 발명의 핵산의 합성 방법은 N-프라이머를 이용하여 cDNA를 합성하여 발현되는 모든 유전정보를 유전자의 양 말단 및 중간의 어느 지점이라도 동일한 확률로 그 정보를 획득될 수 있도록 설계된 것이다. N-프라이머는 기존의 프라이머와 달리 모든 가능한 조합의 염기 서열을 가지고 있기 때문에 시료 내에 존재하는 모든 서열에 상보적일 것으로 추측되며, 이러한 특징으로 인해 시료 내 존재하는 어떠한 염기서열을 가진 RNA라도 cDNA로 전환될 것으로 생각된다. 따라서 poly-A 테일을 가지지 않은 조각난 mRNA, rRNA, 바이러스 또는 원핵생물의 RNA, DNA 등의 모든 생물체의 모든 종류의 RNA 및 DNA로부터 핵산을 합성할 수 있다. 진핵세포의 발현 유전자의 정보를 획득하는 방법으로 조직발현 유전자[Expressed Sequence Tag(EST)]의 중복을 획기적으로 회피할 수 있는 방법이다. 이는 중복 회피뿐만 아니라 하나의 mRNA를 여러 조각으로 분리시켜 핵산을 합성하기 때문에 중복의 효과도 나타낼 수 있다.
- [0097] 본 발명의 핵산 합성 방법은 바이러스 RNA를 주형으로 하고, N-프라이머를 상기 주형에 어닐링시켜 제1가닥 (first strand) cDNA를 합성하는 단계를 포함한다. 제1가닥 cDNA를 합성하는 방법은 당업계에 통상적으로 이용되는 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들면, 역전사효소, RNase 불록 리보뉴클레아제 저해제 등을 이용하여 제1가닥 cDNA를 합성할 수 있다. 역전사 효소의 예는 다양한 소스로부터 기원한 역전사 효소, 예를 들면, 조류 골수아세포증바이러스-유래 역전사 효소(avian myeloblastosis virus-derived virus reverse transcriptase(AMV RTase)), 마우스 백혈병 바이러스-유래된 역전사 효소(murine leukemia virus-derived virus reverse transcriptase(MMLV RTase) 및 라우스-관련 바이러스 2 역전사효소 (Rous-associated virus 2 reverse transcriptase(RAV-2 RTase)를 포함한다.
- [0098] 그러나 프라이머는 특정 N-프라이머를 이용하는 것이다. N-프라이머는 각각의 뉴클레오티드 위치에 G, A, T 및 C가 모두 위치할 수 있는 프라이머로서, 예를 들면, 30개 뉴클레오티드의 N-프라이머라면 예상할 수 있는 프라이머의 조합의 수는 4³⁰ 개이다. 상기 N-프라이머의 길이는 5~50개 뉴클레오티드인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 25~30개 뉴클레오티드이다. N-프라이머의 길이가 상기 범위를 벗어나면 원하는 크기의 핵산 합성의 효율이 저하될 가능성이 있기 때문이다.
- [0099] 본 발명의 검출 방법은 상기 프로브와 핵산 시료 사이의 혼성화 정도를 검출하는 단계를 포함한다.
- [0100] 본 명세서에 있어서, "혼성화"란 핵산의 2개의 상보적 가닥이 조합하여 이중가닥 분자 (혼성체)를 형성하는 과정을 말한다.
- [0101] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 핵산 시료는 검출가능한 표지 물질로 표지될 수 있다. 본 구체예에서, 상기 표지 물질은 형광, 인광 또는 방사성을 발하는 물질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 상기 표지 물질은 Cy-5 또는 Cy-3이다. 제1가닥 cDNA 합성시 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 합성을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지될 수 있다. 또한, 방사성 물질을 이용한 표지는 제1가닥 cDNA 합성시 ³²P 또는 ³⁵S 등과 같은 방사성 동위원소를 반응액에 첨가하면 합성 산물이 합성되면서 방사성이 합성 산물에 혼입되어 합성 산물이 방사성으로 표지될 수 있다.
- [0102] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 프로브 세트는 마이크로어레이의 기판 상에 고정화될 수 있다. 마이크로어레이

기관 상에 고정화되는 올리고뉴클레오티드 프로브 세트에 대하여는 상기 기재한 바와 같다.

[0103] 본 발명은 또한, 본 발명에 따른 올리고뉴클레오티드 프로브 세트; 및 혼성화 용액을 포함하는, AMV, BaYMV, BaMMV, BBWV2, CMV, CGMMV, KGMMV, MNSV, ORSV, OYDV, PRSV, PMMoV, PepMoV, PLRV, PVX, PVY, RBSDV, RSV, RMV, SLV, SMV, SqMV, SPFMV, TMGMV, TMV, TRV, ToMV, TuMV, WMV2 및 ZYMV로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 바이러스를 검출하기 위한 키트를 제공한다.

[0104] 본 발명의 키트는 올리고뉴클레오티드 프로브 세트 및 혼성화 용액을 포함하는데, 올리고뉴클레오티드 프로브 세트는 전술한 바와 같다. 그리고, 혼성화 용액은 프로브와 핵산 시료가 혼성화할 수 있게 하는 완충액으로서, 당업계에 공지된 용액을 이용할 수 있다. 상기 키트에는 프로브와 혼성화한 핵산을 검출할 수 있는 검출기를 추가로 포함할 수 있다. 상기 검출기는 스캐너, 분광광도계(spectrophotomer), 액체섬광계수기(liquid scintillation counter) 등을 이용할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 설명서를 추가로 포함할 수 있다.

[0105]

[0106] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0107] **실시예**

[0108] **실험 방법**

[0109] **바이러스 분리주 수집**

[0110] 바이러스 분리주 수집은 각 바이러스의 자연기주를 채집하여 진단용 특이 프라이머를 이용하여 RT-PCR 방법으로 진단하였다. 진단대상 바이러스 30종을 분리한 자연기주는 상기 표 1과 같다.

[0111] **진단대상 바이러스의 확보 및 검정**

[0112] 대상 바이러스로 선정된 30종의 바이러스는 대부분 자연상태에서 발병한 시료를 채집하거나 또는 연구실에 냉동 보관 중인 시료를 재접종하여 확보하였다. 확보한 이들 바이러스는 종 특이적인 프라이머를 이용하여 RT-PCR 방법으로 진단하였으나, 올리고 칩 결과의 정밀한 분석을 위하여 다른 바이러스의 복합감염여부까지 세밀히 조사하였다. 또한 진단용 프라이머 또는 기주 유전자에 의한 비특이적 반응으로 인한 오진단을 방지하기 위하여 각 각 바이러스의 관련 RT-PCR 산물의 염기서열을 분석하였다. 확인된 바이러스는 즙액접종을 통하여 지표식물에 증식하였다. 즙액접종이 안되는 바이러스는 채집한 자연기주를 정밀진단한 다음 칩 분석에 사용하였다.

[0113] **식물 총 RNA 추출 (바이러스 RNA + 식물 RNA)**

- [0114] 1. 식물 조직을 수확하고, 중량을 재었다.
- [0115] 2. 식물 조직을 액체 질소를 이용하여 막자사발에서 분쇄하였다.
- [0116] 3. Trizol 1ml을 첨가하고, 혼합하였다 (trizol 1ml/조직 0.1g)
- [0117] 4. 200ul 클로로포름 (Trizol 부피의 1/5)을 첨가하고, 30초 동안 볼텍싱하였다.
- [0118] 5. 실온에서 5분간 방치하였다.
- [0119] 6. 4℃에서 5분간 13000rpm에서 원심분리하고, 상층액을 취하였다.
- [0120] 7. 4~6 단계를 반복하였다.
- [0121] 8. 80% 이소프로판올을 첨가하고, 볼텍싱을 하였다.
- [0122] 9. 4℃에서 15분간 13000rpm에서 원심분리하고, 상층액을 조심스럽게 버렸다.
- [0123] 10. 2ml 100% EtOH을 첨가하고, 4℃에서 10분간 13000rpm에서 원심분리하였다.
- [0124] 11. 용액을 조심스럽게 버리고, 80% EtOH (2ml)을 첨가하였다.

- [0125] 12. 4℃에서 15분간 13000rpm에서 원심분리하였다.
- [0126] 13. 펠렛을 건조시키고, RNA용 증류수 또는 DEPC 물에 재현탁하였다.

[0127] **cDNA 합성**

- [0128] A. 단일 염료 (single dye)
- [0129] 1. 30ug 이상의 샘플 총 RNA에 프라이머를 첨가한 RNA 양의 1/10 정도의 양으로 넣었다.
- [0130] 2. 70℃에서 10분 정도 반응시켰다.
- [0131] 3. 얼음에서 놓아둔 후 충분히 온도가 내려가게 하였다.
- [0132] 4. 최종 반응액의 1/5의 5X 반응 버퍼(Dyomics Co.)를 넣고 1/10의 10mM dNTPs를 첨가하였다.
- [0133] 5. 최종 반응액의 1/10의 cy5 또는 cy3 dUTP dye를 넣고 37℃에서 5분 정도 방치하였다
- [0134] 6. 탭핑 후 원심분리하고 MuLV-RT 효소(Fermantas Co.)를 2 unit/30ul 정도 첨가하였다.
- [0135] 7. 42℃에서 2시간 인큐베이션하여 반응하였다.(광차단)
- [0136] 8. 얼음에 놓아 반응을 끝내고 원심분리하였다.
- [0137] 9. DNA clean kit(Zymo Research Co.)를 이용하여 DNA 농도를 높여서 DEPC 물로 용출하였다.
- [0138] B. Dye swapping
- [0139] 1. 30ug 이상의 샘플 총 RNA에 프라이머를 첨가한 RNA 양의 1/10 정도의 양을 첨가하였다. 동량의 대조구 (control) RNA에도 프라이머를 첨가한 샘플 RNA 양의 1/10 정도를 첨가하였다.
- [0140] 2. 70℃에서 10분 정도 반응시킨 후 얼음에 두었다.
- [0141] 3. 최종 반응액의 1/5의 5X 반응 버퍼(Dyomics Co.)를 넣고 1/10의 10mM dNTPs를 넣어주었다.
- [0142] 4. 최종 반응액의 1/10 정도의 양 cy5 dUTP dye를 샘플에 넣고 동량의 cy3 dUTP dye를 대조구에 넣었다 (cy3가 감광이 더 좋으므로 대조구에 넣어주는 것이 적절하다).
- [0143] 5. 37℃에서 5분 정도 두었다.
- [0144] 6. 탭핑 후 원심분리하고 MuLV-RT 효소(Fermantas Co.)를 2 unit/30ul 정도 넣었다.
- [0145] 7. 42℃에서 2시간 인큐베이션하여 반응하였다.(광차단)
- [0146] 8. 얼음에 놓아 반응을 끝내고 원심분리하였다.
- [0147] 9. DNA clean kit(Zymo Research Co.)를 이용하여 DNA 농도를 높여서 DEPC 물로 용출하였다.

[0148] **혼성화**

- [0149] 1. 용출한 cDNA를 2X 혼성화 버퍼(25% 포름아미드, 5X SSC, 0.1% SDS)와 동량 섞었다 (two dye로 cDNA를 합성했을 시 샘플 cDNA와 대조구 cDNA를 섞은 양을 2X 혼성화 버퍼와 동량 섞으면 된다).
- [0150] 2. 블텍스 후 원심분리하고, 95℃에서 5분 정도 가열하여 남은 모든 효소를 제거하였다.
- [0151] 3. 슬라이드의 올리고 스팟이 올려진 곳에 정량을 피펫팅해 놓고, 커버슬립으로 기포가 들어가지 않도록 덮어주었다.
- [0152] 4. jar의 4 모서리에 2X SSC를 넣고 슬라이드를 jar에 넣고 조였다.
- [0153] 5. 42℃의 수조에서 16시간 정도 혼성화하였다.

[0154] **세정 (Washing)**

- [0155] 1. 세정액 1 (2X SSC, 0.1% SDS)을 세정에 들어가기 전에 42℃에서 미리 가열하였다 (30~40 분).
- [0156] 2. 세정액 1에서 슬라이드를 담궈서 커버슬립을 떼어냈다. 슬라이드를 5분 정도 흔들어서 주었다.
- [0157] 3. 세정액 2 (0.1X SSC, 0.1% SDS)를 42℃에서 슬라이드를 흔들어서 세정하였다.
- [0158] 4. 세정액 2를 튜브에 담아 슬라이드를 넣고 교반기로 돌려가며 세정하였다.
- [0159] 5. 세정액 3 (0.1X SSC)를 여러 튜브에 나누어 담아 슬라이드를 넣고 교반기로 돌려가며 다음 튜브로 옮겨가며 세정하였다.
- [0160] 6. 슬라이드를 spin machine으로 건조시킨 후 스캐너로 확인하였다. cy5 dUTP는 640nm에서 흡광시에 붉은 감광 반응을 나타내고, cy3 dUTP는 540nm에서 녹색으로 감광한다.

[0161] **실시예 1: 30종 바이러스 진단용 올리고뉴클레오타이드 프로브 설계 및 제작**

[0162] 우선적으로 국내에서 발생이 많고 피해가 큰 15종의 바이러스 및 분리주(isolate)에 대한 올리고뉴클레오타이드를 제작하기 위하여 130개의 바이러스 유래 서열에 포함된 총 864 kb의 염기서열을 분석하여 약 1,900여 개의 올리고뉴클레오타이드를 설계하였다. 이들 가운데 GC 함량, 융점, 헤어핀(hairpin) dG, 헤어핀 결합(hairpin bond), self dimer 및 self bond의 정도에 따라 100개의 가장 적절한 올리고뉴클레오타이드를 선발하였다. 바이러스 유래 염기서열에 빈번하게 나타나고 복제 또는 전사의 중요 요소로 기능을 하는 헤어핀 또는 팔린드롬(palindromic) 등과 같은 2차 구조의 형성 지역은 가급적 배제하였다.

[0163] 우선적으로 국내에서 발생이 많고 피해가 큰 25종의 바이러스 및 분리주(isolate)에 대한 올리고뉴클레오타이드를 제작하기 위하여 2,500개의 바이러스 유래 서열에 포함된 총 12,000 kb의 염기서열을 분석하여 약 4,300 여개의 올리고뉴클레오타이드를 설계하였다. 이들 가운데 GC 함량, 융점, 헤어핀(hairpin) dG, 헤어핀 결합(hairpin bond), self dimer 및 self bond의 정도에 따라 70 여개의 가장 적절한 올리고뉴클레오타이드를 선발하였다. 바이러스 유래 염기서열에 빈번하게 나타나고 복제 또는 전사의 중요 요소로 기능을 하는 헤어핀 또는 팔린드롬(palindromic) 등과 같은 2차 구조의 형성 지역은 가급적 배제하였다.

[0164] 상기 과정에 의해 디자인된 올리고뉴클레오타이드 프로브 서열은 상기 표 2에 기재된 바와 같다.

[0165] **실시예 2: 30종 바이러스 진단용 올리고뉴클레오타이드 칩의 제작 및 검증**

[0166] 당업계에서 통상적으로 이용되는 칩 제작 기술을 이용하여 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 칩을 제작하였으며, 올리고뉴클레오타이드 칩에 고정된 프로브의 배열 순서는 하기와 같다.

Oligo Chip 배열 순서

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	AMV1	CMV1	AMV2	CMV2	AMV3	CMV3	BaYMV1	CMV4	BaYMV2	CMV5	BaYMV3	CMV6
2	KGMMV2	OYDV3	KGMMV3	PRSV1	KGMMV4	PRSV2	MNSV1	PRSV3	MNSV2	PMMoV1	MNSV3	PMMoV2
3	PepMoV5	RBSDV3	PLRV1	RSV1	PLRV2	RSV2	PLRV3	RSV3	PVX1	RSV4	PVX2	RSV5
4	SLV3	TMGMV2	SLV4	TMGMV3	SMV1	TMGMV4	SMV2	TMGMV5	SMV3	TMGMV6	SqMV1	TMGMV7
5	TMV5	WMV21	TMV6	WMV22	TRV1	WMV23	TRV2	ZYMV1	TRV3	ZYMV2	ToMV1	ZYMV3

	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	BaMMV1	CMV7	BaMMV2	CMV8	BaMMV3	CGMMV1	BBWV21	CGMMV2	BBWV22	CGMMV3	BBWV23	KGMMV1
2	MNSV4	PMMoV3	ORSV1	PMMoV4	ORSV2	PepMoV1	ORSV3	PepMoV2	OYDV1	PepMoV3	OYDV2	PepMoV4
3	PVX3	RMV1	PVY1	RMV2	PVY2	RMV3	PVY3	RMV4	RBSDV1	SLV1	RBSDV2	SLV2
4	SqMV2	TMGMV8	SqMV3	TMGMV9	SPFMV1	TMV1	SPFMV2	TMV2	SPFMV3	TMV3	TMGMV1	TMV4
5	ToMV2	ZYMV4	ToMV3	ToMV4	TuMV1	TuMV2	TuMV3	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank

- [0167]
- [0168] 도 1은 TMV, CGMMV, KGMMV, RMV, TMGMV, ToMV, PMMoV 및 ORSV에 대한 칩 검증 결과이다. ORSV는 single dye 방법을 이용하였으며 (시료를 Cy3(녹색)으로 표지함), TMV, CGMMV, KGMMV, RMV, TMGMV, ToMV 및 PMMoV는 dye swapping 방법을 이용하였다 (시료를 Cy3(녹색)으로 표지하고, 대조구를 Cy5(적색)으로 표지함).
- [0169] TMV 패널에서 기주 식물은 담배이며, 숫자 1 내지 6은 각각 TMV1 내지 TMV6의 프로브를 나타낸다.
- [0170] CGMMV 패널에서 기주 식물은 오이이며, 숫자 1 내지 3은 각각 CGMMV1 내지 CGMMV3의 프로브를 나타내며, 숫자 4는 AMV3 특이적인 프로브를 나타낸다.
- [0171] KGMMV 패널에서 기주 식물은 오이이며, 숫자 1 내지 3은 각각 KGMMV1 내지 KGMMV3의 프로브를 나타내며, 숫자 4 및 5는 RMV 특이적인 프로브를 나타낸다.
- [0172] RMV 패널에서 기주 식물은 담배이며, 숫자 1 내지 4는 각각 RMV1 내지 RMV4의 프로브를 나타내며, 숫자 5 내지 7은 TMGMV 특이적인 프로브를 나타내며, 숫자 8은 ZYMV 특이적인 프로브를 나타낸다.
- [0173] TMGMV 패널에서 기주 식물은 고추이며, 숫자 1 내지 9는 각각 TMGMV1 내지 TMGMV9의 프로브를 나타내며, 숫자 10은 KGMMV 특이적인 프로브를 나타내며, 숫자 11은 WMV2 특이적인 프로브를 나타내며, 숫자 12는 CGMMV 특이적인 프로브를 나타낸다.
- [0174] ToMV 패널에서 기주 식물은 고추이며, 숫자 1 내지 3은 각각 ToMV1 내지 ToMV3의 프로브를 나타낸다.
- [0175] PMMoV 패널에서 기주 식물은 고추이며, 숫자 1 내지 3은 각각 PMMoV1 내지 PMMoV3의 프로브를 나타내며, 숫자 4는 ZYMV 특이적인 프로브를 나타내며, 숫자 5는 TMV 특이적인 프로브를 나타낸다.
- [0176] ORSV 패널에서 기주 식물은 난(orchid)이며, 숫자 1 내지 3은 각각 ORSV1 내지 ORSV3의 프로브를 나타내며, 숫자 4는 RMV 특이적인 프로브를 나타낸다.
- [0177] 도 1에서 알 수 있는 바와 같이, TMV, CGMMV, KGMMV, RMV, TMGMV, ToMV, PMMoV 및 ORSV에 대해 특이적인 각각의 프로브는 각각의 바이러스를 특이적으로 검출할 수 있다는 것을 알 수 있다.
- [0178] 도 2는 WMV2, ZYMV, SMV, PepMoV, TuMV, PVY, SPFMV, OYDV 및 PRSV에 대한 칩 검증 결과이다. OYDV는 single dye 방법을 이용하였으며 (시료를 Cy3(녹색)으로 표지함), WMV2, ZYMV, SMV, PepMoV, TuMV, PVY, SPFMV 및 PRSV는 dye swapping 방법을 이용하였다 (시료를 Cy3(녹색)으로 표지하고, 대조구를 Cy5(적색)으로 표지함).
- [0179] WMV2 패널에서 기주 식물은 gourd이며, 숫자 1 내지 3은 각각 WMV21 내지 WMV23의 프로브를 나타내며, 숫자 4는 PVY1 특이적인 프로브를 나타낸다.

- [0180] ZYMV 패널에서 기주 식물은 오이이며, 숫자 1 내지 4는 각각 ZYMV1 내지 ZYMV4의 프로브를 나타낸다.
- [0181] SMV 패널에서 기주 식물은 콩(soybean)이며, 숫자 1 내지 3은 각각 SMV1 내지 SMV3의 프로브를 나타낸다.
- [0182] PepMoV 패널에서 기주 식물은 담배이며, 숫자 1 내지 5는 각각 PepMoV1 내지 PepMoV5의 프로브를 나타낸다.
- [0183] TuMV 패널에서 기주 식물은 상추이며, 숫자 1 내지 3은 각각 TuMV1 내지 TuMV3의 프로브를 나타낸다.
- [0184] PVY 패널에서 기주 식물은 감자이며, 숫자 1 내지 3은 각각 PVY1 내지 PVY3의 프로브를 나타낸다.
- [0185] SPFMV 패널에서 기주 식물은 고구마이며, 숫자 1 내지 3은 각각 SPFMV1 내지 SPFMV3의 프로브를 나타낸다.
- [0186] OYDV 패널에서 기주 식물은 마늘이며, 숫자 1 내지 3은 각각 OYDV1 내지 OYDV3의 프로브를 나타내며, 숫자 4 및 5는 RMV 특이적인 프로브를 나타낸다.
- [0187] PRSV 패널에서 기주 식물은 호박이며, 숫자 1 내지 3은 각각 PRSV1 내지 PRSV3의 프로브를 나타내며, 숫자 4는 ZYMV 특이적인 프로브를 나타낸다.
- [0188] 도 2에서 알 수 있는 바와 같이, WMV2, ZYMV, SMV, PepMoV, TuMV, PVY, SPFMV, OYDV 및 PRSV에 대해 특이적인 각각의 프로브는 각각의 바이러스를 특이적으로 검출할 수 있다는 것을 알 수 있다.
- [0189] 도 3은 CMV(박과), CMV(가지과), MNSV, PVX, PLRV, RBSDV, BaYMV, BaMMV, RSV, SLV, SqMV, AMV 및 BBWV2에 대한 칩 검증 결과이다. SLV 및 BBWV2는 single dye 방법을 이용하였으며 (시료를 Cy3(녹색)으로 표지함), CMV(박과), CMV(가지과), MNSV, PVX, PLRV, RBSDV, BaYMV, BaMMV, RSV, SqMV 및 AMV는 dye swapping 방법을 이용하였다 (시료를 Cy3(녹색)으로 표지하고, 대조구를 Cy5(적색)으로 표지함).
- [0190] CMV(박과) 패널에서 기주 식물은 오이이며, 숫자 1 내지 8은 각각 CMV1 내지 CMV8의 프로브를 나타내며, 숫자 9는 TuMV 특이적인 프로브를 나타내며, 숫자 10은 PVY 특이적인 프로브를 나타낸다.
- [0191] CMV(가지과) 패널에서 기주 식물은 담배이며, 숫자 1 내지 8은 각각 CMV1 내지 CMV8의 프로브를 나타낸다.
- [0192] MNSV 패널에서 기주 식물은 메론이며, 숫자 1 내지 4는 각각 MNSV1 내지 MNSV4의 프로브를 나타낸다.
- [0193] PVX 패널에서 기주 식물은 감자이며, 숫자 1 내지 3은 각각 PVX1 내지 PVX3의 프로브를 나타내며, 숫자 4는 PVY 특이적인 프로브를 나타내며, 숫자 5는 TRV 특이적인 프로브를 나타낸다.
- [0194] PLRV 패널에서 기주 식물은 감자이며, 숫자 1 내지 3은 각각 PLRV1 내지 PLRV3의 프로브를 나타낸다.
- [0195] RBSDV 패널에서 기주 식물은 벼이며, 숫자 1 내지 3은 각각 RBSDV1 내지 RBSDV3의 프로브를 나타낸다.
- [0196] BaYMV 패널에서 기주 식물은 보리이며, 숫자 1 내지 3은 각각 BaYMV1 내지 BaYMV3의 프로브를 나타낸다.
- [0197] BaMMV 패널에서 기주 식물은 보리이며, 숫자 1 내지 3은 각각 BaMMV1 내지 BaMMV3의 프로브를 나타낸다.
- [0198] RSV 패널에서 기주 식물은 벼이며, 숫자 1 내지 5는 각각 RSV1 내지 RSV5의 프로브를 나타낸다.
- [0199] SLV 패널에서 기주 식물은 마늘이며, 숫자 1 내지 4는 각각 SLV1 내지 SLV4의 프로브를 나타낸다.
- [0200] SqMV 패널에서 기주 식물은 호박이며, 숫자 1 내지 3은 각각 SqMV1 내지 SqMV3의 프로브를 나타낸다.
- [0201] AMV 패널에서 기주 식물은 땅콩이며, 숫자 1 내지 3은 각각 AMV1 내지 AMV3의 프로브를 나타낸다.
- [0202] BBWV2 패널에서 기주 식물은 페튜니아이며, 숫자 1 내지 3은 각각 BBWV21 내지 BBWV23의 프로브를 나타낸다.
- [0203] 도 3에서 알 수 있는 바와 같이, CMV(박과), CMV(가지과), MNSV, PVX, PLRV, RBSDV, BaYMV, BaMMV, RSV, SLV, SqMV, AMV 및 BBWV2에 대해 특이적인 각각의 프로브는 각각의 바이러스를 특이적으로 검출할 수 있다는 것을 알 수 있다.

도면의 간단한 설명

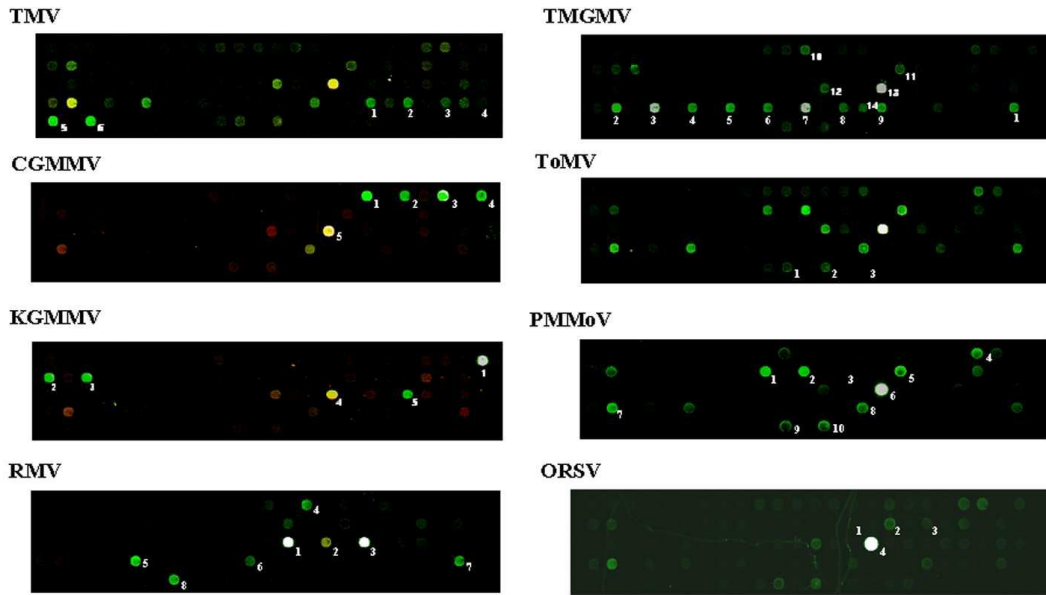
- [0204] 도 1은 TMV, CGMMV, KGMMV, RMV, TMGMV, ToMV, PMMoV 및 ORSV에 대한 칩 검증 결과이다.
- [0205] 도 2는 WMV2, ZYMV, SMV, PepMoV, TuMV, PVY, SPFMV, OYDV 및 PRSV에 대한 칩 검증 결과이다.

[0206]

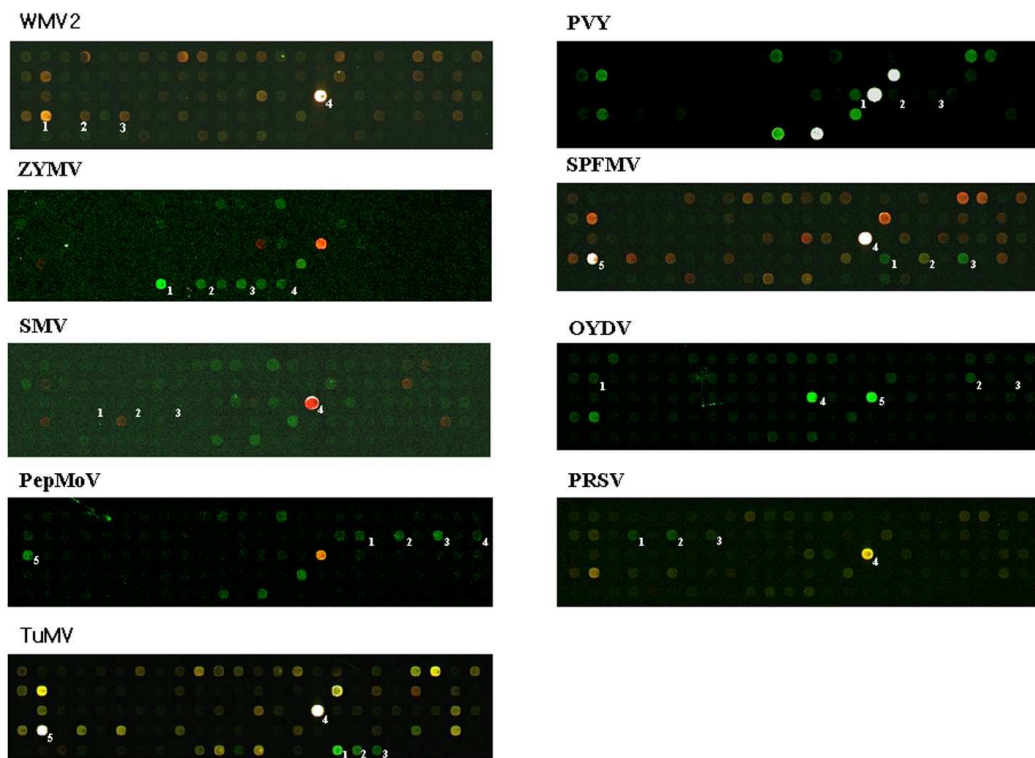
도 3은 CMV(박과), CMV(가지과), MNSV, PVX, PLRV, RBSDV, BaYMV, BaMMV, RSV, SLV, SqMV, AMV 및 BBWV2에 대한 칩 검증 결과이다.

도면

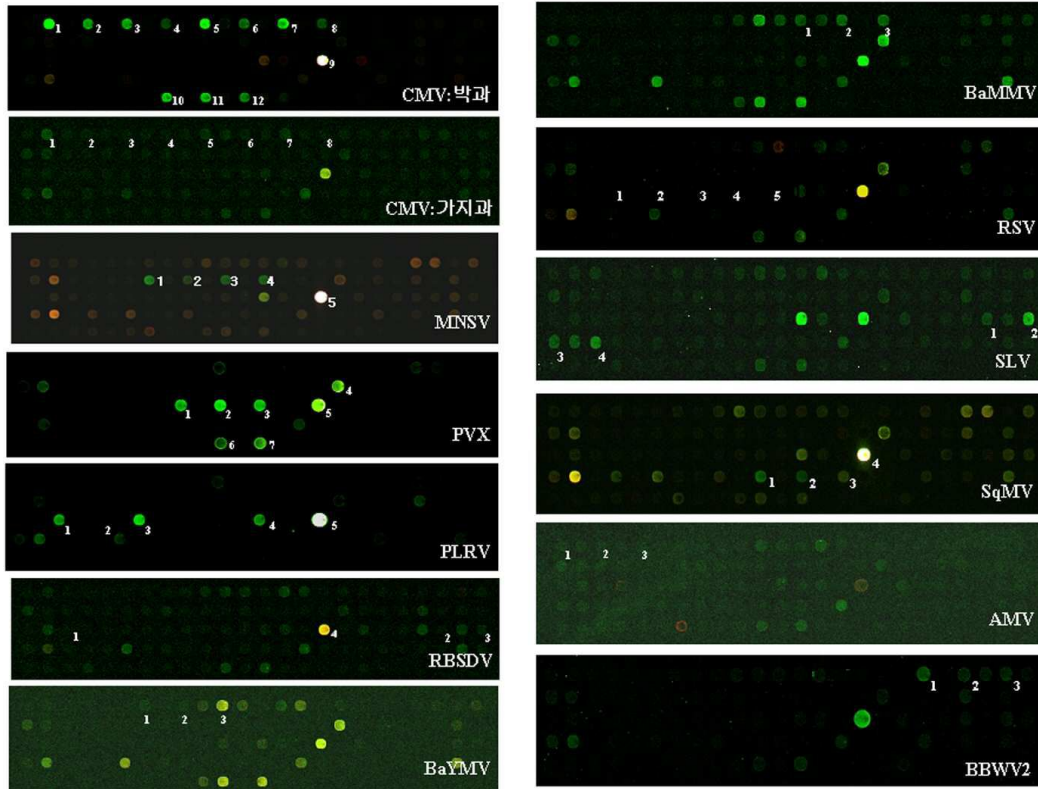
도면1



도면2



도면3



서열 목록

- <110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
- <120> Probe set, microarray, method and kit for detecting plant virus

- <160> 115

- <170> Kopatent In 1.71

- <210> 1
- <211> 45
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> AMV probe

- <400> 1

gccctttggt tggacttcga cgctctgcct gagggatcta agaat 45

<210> 2
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> AMV probe

<400> 2
 atctcttaaa tgctgggaaa ttgacggact ttgttcttga taggac 46

<210> 3
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> AMV probe

<400> 3
 ctcatcagag tatgttcccg agtattccgt tgaagagatt tccaa 45

<210> 4
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> BaYMV probe

<400> 4
 aatggcttc gttgatgcgc agggagtccg taagttcact caatc 45

<210> 5
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> BaYMV probe

<400> 5
cataaagcaa gcaccaagta tcacagccaa acatatcttc ccaac 45

<210> 6
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BaYMV probe

<400> 6
acataattga gacaggtgtt actcttagcg ttgatttgtt tgttgatt 48

<210> 7
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BaMMV probe

<400> 7
gataactcaag gactacacgc accgcaacac tgatctgata ggaac 45

<210> 8
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BaMMV probe

<400> 8

ctacaaccca atacaaacaa cgaacaacaa tcaaacaaac aaacacaca 49

- <210> 9
- <211> 45
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> BaMMV probe

<400> 9
caacacctgc tcttgacaat ctaacggact tcacaacaat tcttc 45

- <210> 10
- <211> 49
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> BBWV probe

<400> 10
caatggatga agtagacttg gacactgcta tcaatggctt ggaagatgt 49

- <210> 11
- <211> 45
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> BBWV probe

<400> 11
gcggaattgg attggcagtg agttatgttg agggaaatga gagtg 45

- <210> 12
- <211> 46
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> BBWV probe

<400> 12
 cgtcctgaac ttgtcgcagt gttggataga tacttcacag agatca 46

<210> 13
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CMV probe

<400> 13
 cataaccatg atcttcccgc tttagtgtct ttccaaccga cgtatgattg 50

<210> 14
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CMV probe

<400> 14
 aactattaac cacccaacct ttgtagggag tgaacgctgt aaacctgggt 50

<210> 15
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CMV probe

<400> 15

gagtcgagtc atggacaaat ctgaatcaac cagtgtggt cgtaaccgtc 50

<210> 16
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CMV probe

<400> 16
 gatgcgcgt gatattggcg acatgagaaa gtacgccgtc ctcgtgtatt 50

<210> 17
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CMV probe

<400> 17
 atttgattct accgtgtggg tgacagtccg taaagttcct gcctcctcgg 50

<210> 18
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CMV probe

<400> 18
 gtgctcccag ttgaaactcg tgttttccag gatcctccct ccggt 45

<210> 19
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CMV probe

<400> 19
 tgcgtttcgt ctctcggatc tttagagagt ctgtgttg ttttc 45

<210> 20
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CMV probe

<400> 20
 gagttcaggg ttgacgtgt aaattccaac aaacagcga aagaat 45

<210> 21
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CGMMV probe

<400> 21
 gggataaaga cgctcattta ctatcaacgg aagtctggtg atgta 45

<210> 22
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CGMMV probe

<400> 22

aaacctccaa atcggaggtt ggactctgct tctgaagagt ccagt 45

- <210> 23
- <211> 49
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> CGMMV probe

<400> 23
ggatgtaact gaagatatgg aggatatagt gttgatggcg gacaagagt 49

- <210> 24
- <211> 45
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> KGMMV probe

<400> 24
ttcaaccctt cttgactca gttccaatta cggcggctgt catcg 45

- <210> 25
- <211> 45
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> KGMMV probe

<400> 25
agtggttggt caggtctctt tttgcgaagt cttctgtcta gatat 45

- <210> 26
- <211> 45
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> KGMMV probe

<400> 26
 atttcgaggc taagttgttt aagaaaaggt atgggtactt ttgtg 45

<210> 27
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> KGMMV probe

<400> 27
 ctggtgagat gttaatctgg gaaagattgg gtttagacga cattc 45

<210> 28
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> MNSV probe

<400> 28
 ctgccattag ctcttatgct cattacgctg attcagcgc ttgggctgag 50

<210> 29
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> MNSV probe

<400> 29

gaaatcgttg gaggggttaa gtgttcaacg aagggatgcc tatctgaaaa 50

- <210> 30
- <211> 45
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> MNSV probe

<400> 30
 tgtcgattc aaagatcccc agccaattgc tggaatggtt tgtat 45

- <210> 31
- <211> 45
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> MNSV probe

<400> 31
 tgattcaacg ccttgggcag agaacgtttt agtggttccg tgtga 45

- <210> 32
- <211> 45
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> ORSV probe

<400> 32
 ctcaaagtga caaagccgaa ctgaaggagc gtggttatga agaag 45

- <210> 33
- <211> 49
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> ORSV probe

<400> 33
 tggatgatagt gatgttgga ttagtgttgt agatgatatt gtggtcggg 49

<210> 34
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> ORSV probe

<400> 34
 gccacacttg ttacatcgt agggaggta ggaggttacc acttaga 47

<210> 35
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> OYDV probe

<400> 35
 gccttcaaac aatcgcaaac acaaacacac tcaaagcaa ttcac 45

<210> 36
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> OYDV probe

<400> 36

tgcatgtgat tcgccgacgg actctgacaa tgacgaagat tatta 45

- <210> 37
- <211> 45
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> OYDV probe

<400> 37
tattataggg attgtggaga ggtgttacag tttgagcatg acatg 45

- <210> 38
- <211> 45
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> PRSV probe

<400> 38
tgaggttggg ttaaggcgt tataactag taagcgtggg tcaat 45

- <210> 39
- <211> 45
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> PRSV probe

<400> 39
ttgaggcgt tataactag taagcgtggg tcaatggatg aattg 45

- <210> 40
- <211> 45
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PRSV probe

<400> 40
 tttagaatac agtgtggctg tgccaccgct tctatTTTTat agtga 45

<210> 41
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PMMoV probe

<400> 41
 tgaacgatct tgctaacgag agactgtacg aatcagcggc cgaacaatgc 50

<210> 42
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PMMoV probe

<400> 42
 actcggagtc atcggacgcc gagtcttctt cgttttaact atggc 45

<210> 43
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PMMoV probe

<400> 43

cggaatgta caatcaagct ctgttcgaga gcgagtgagg actca 45

- <210> 44
- <211> 45
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> PMMoV probe

<400> 44
ccttatacat gatggtgtaa ataattgga cgaacgttat acgtc 45

- <210> 45
- <211> 50
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> PepMoV probe

<400> 45
aattcagaga acctgcgtca acagatagag tgtgcctcat tggatcaaac 50

- <210> 46
- <211> 45
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> PepMoV probe

<400> 46
tgcgtgattc ggttattcca ttaagtgaga gttcaattcc ataca 45

- <210> 47
- <211> 45
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PepMoV probe

<400> 47
 cactgatttg tatgcaattc cacgtacttt agcagttgtg gaaag 45

<210> 48
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PepMoV probe

<400> 48
 aacagtgga attcccatta aagcccgtga tagagaatgc taagc 45

<210> 49
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PepMoV probe

<400> 49
 gaacttcagg tctacctcag atatttcgct gaagcggatg aagag 45

<210> 50
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PLRV probe

<400> 50

tggtcttcaa agaattctgct tgggtgtgctt aaaggcttcc cactggaaga 50

- <210> 51
- <211> 50
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> PLRV probe

<400> 51
 ttgtcagaa atgctatttg ctcctggaa ctccgtgaaa gaaatatccc 50

- <210> 52
- <211> 45
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> PLRV probe

<400> 52
 gcattggaag ttcaagcctc gttacatcaa cggacaaaa tagat 45

- <210> 53
- <211> 45
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> PVX probe

<400> 53
 tctcaagccg ctctccggtg aacggttaag tttccattga tactc 45

- <210> 54
- <211> 45
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PVX probe

<400> 54
 gccgatctca agccactctc cgttgaacgg ttaagtttcc attga 45

<210> 55
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PVX probe

<400> 55
 ggctgtgtc actctaccac caccataact acgtctacat aaccg 45

<210> 56
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PVY probe

<400> 56
 acttgagtgc gatacttatg aagtgcacca tcaaggaaat gacac 45

<210> 57
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PVY probe

<400> 57

gataagtgga ctgttatgtg tctgaagcat ctgcaagga cggac 45

- <210> 58
- <211> 45
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> PVY probe

<400> 58
gataagtgga ctgttatgtg tctgaagcat ctgcaagga cggac 45

- <210> 59
- <211> 46
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> RBSDV probe

<400> 59
aagatgatg gcgatctcca cttccagaa caattcacta atgacg 46

- <210> 60
- <211> 45
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> RBSDV probe

<400> 60
atctttaggt gcttcatttg atgtcgatgc tgcaattgaa ttcgg 45

- <210> 61
- <211> 45
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RBSDV probe

<400> 61
 gcttcatttg atgtcgatgc tgcaattgaa ttcggtgcac atgtt 45

<210> 62
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RSV probe

<400> 62
 aaacatcgta atctaaaaac ccacactcca ctggctgtct agtgg 45

<210> 63
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RSV probe

<400> 63
 gtacagcctt gtctgattcc cataagtgcg gatcgatttg acaga 45

<210> 64
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RSV probe

<400> 64

gtgagacatt agggaatagt tgagccagct ttccaagtgt gatag 45

- <210> 65
- <211> 45
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> RSV probe

<400> 65
tctcacaacc tcatgcgaga catttgggaa tagctgagcc aacct 45

- <210> 66
- <211> 45
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> RSV probe

<400> 66
tctgttgagc caagtacagc ttggtctggt tcccatatgt actga 45

- <210> 67
- <211> 50
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> RMV probe

<400> 67
agtctgagtc cctgtgtgat attgatttgt tagtgaatgt gccattagat 50

- <210> 68
- <211> 50
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RMV probe

<400> 68
 tgccaagggtg gtggtggcga ttatgaatag tgaattgacg ttaccgttca 50

<210> 69
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RMV probe

<400> 69
 agtctgagtc cctgtgtgat attgatttgt tagtgaatgt gccattagat 50

<210> 70
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RMV probe

<400> 70
 gttcattgtg accgaccttt tcagcagtgt gagctaagca ccgttaacgg 50

<210> 71
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> SLV probe

<400> 71

atattatggc taaggaagca gaagaactca gtaagttgcc gactcgc 47

<210> 72
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> SLV probe

<400> 72
 tgttctggga catctgtatg tatttgcca ctgctgtag ttctc 45

<210> 73
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> SLV probe

<400> 73
 cttctgaatg caggtgggtg accgctttga gtcgtttctc tagaa 45

<210> 74
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> SLV probe

<400> 74
 gcatgaataa atggtgctat gagttcgaag ttaaaggctc tgatc 45

<210> 75
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> SMV probe

<400> 75
 tgatttcaca aatgaacaat gtggtgaatt ggcagcggca ataagccagt 50

<210> 76
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> SMV probe

<400> 76
 agcaccagca gtagcaaagg agctggtata agcagcaaag atgta 45

<210> 77
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> SMV probe

<400> 77
 aggaaagcag aaggtagca ctcgcacaaa agggatgggt cgcaagtcg 49

<210> 78
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> SqMV probe

<400> 78

gccacttaca gacttgctc tagtgctcac atggcatatc gatag 45

- <210> 79
- <211> 45
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> SqMV probe

<400> 79
 ggtatcataa gtttggttac ctcaggtatt gtgatgttag ataag 45

- <210> 80
- <211> 49
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> SqMV probe

<400> 80
 gctttcatag ttgtttcggtt gtttgtttcc ttcttttctg ggttttgtt 49

- <210> 81
- <211> 45
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> SPFMV probe

<400> 81
 aatgttggca ccgttggtaac attcgttgtg ccacgtgtca agatg 45

- <210> 82
- <211> 45
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> SPFMV probe

<400> 82
 agtatgaagt tgccaacacc cgttccacc aagaacaatt ccaag 45

<210> 83
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> SPFMV probe

<400> 83
 cgcaagaaga agatacggag aggcacacga caactgatgt tacta 45

<210> 84
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TMGMV probe

<400> 84
 acaaacaaca aacaacaaca atggcacaca tacaatctac aattagcaac 50

<210> 85
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TMGMV probe

<400> 85

ttatgaagga gatagaatgg tgactgagag cgactggagg agggtggctg 50

<210> 86
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TMGMV probe

<400> 86
 gctggagtga tgacgaagga ttcaatgatg agatggttgg gaaaacagga 50

<210> 87
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TMGMV probe

<400> 87
 acaaacaaca aacaacaaca atggcacaca tacaatctac aattagcaac 50

<210> 88
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TMGMV probe

<400> 88
 gtctatcgcg tcatcgagta cgttttaatc aacatgcctt ataca 45

<210> 89
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> TMGMV probe

<400> 89
gttacgctta atgaaatagg cgcaactttc aaaagagaag gtgat 45

<210> 90
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> TMGMV probe

<400> 90
taagagaaat ttcaacgcac cagacctgac ggggacgatt gacat 45

<210> 91
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> TMGMV probe

<400> 91
tacgcttaat gaaataggcg caactttcaa aagagaaggt gatga 45

<210> 92
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> TMGMV probe

<400> 92

tttgagggtt ctattaccag caaaaagatg gtaaggagtg aggtc 45

<210> 93
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TMV probe

<400> 93
 aaataatggt tcatgagaat gattcattgt cagaggtgaa ccttc 45

<210> 94
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TMV probe

<400> 94
 ttagaccgcg tagtcacagc actgttaggt gcattcgaca ctaga 45

<210> 95
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TMV probe

<400> 95
 cgacgaggcc actctcggat cttactacac agcagctgca aag 43

<210> 96
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TMV probe

<400> 96
 tacattgagg tattagagcc tctagttact cgactattag gcgct 45

<210> 97
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TMV probe

<400> 97
 tcatgagaat gattcattgt cagaggtaa ccttctcaaa ggagt 45

<210> 98
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TMV probe

<400> 98
 tggaaagagc agacgaagct actcttggat cctattacac agctg 45

<210> 99
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TRV probe

<400> 99

gaaacagatt gaacgagttc gagctgaaaa ggcatttact acggt 45

<210> 100
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TRV probe

<400> 100
 gacgtttgct acggttaaaa agtcccgaaa ttcgaaaccc tctaa 45

<210> 101
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TRV probe

<400> 101
 caatttcga ttagacaatg ttacgatcaa aagtggaaac tggaa 45

<210> 102
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> ToMV probe

<400> 102
 gaaagtagtc tgggttgct gtttttagtt ggtcttggtg tgtcc 45

<210> 103
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> ToMV probe

<400> 103
 ttgaaagta gctgggttg tctgtttta gttggtcttg ttgtgtc 47

<210> 104
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> ToMV probe

<400> 104
 cagatttctt ggcgatgttt ataagtgta caggttacta ggaat 45

<210> 105
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> ToMV probe

<400> 105
 ctttcctca gaccaccgtc agatttcttg gtgatgtta taaggt 46

<210> 106
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TuMV probe

<400> 106

caacacgctc atggtcatac tggcagtcaa ctattcactc aagaaaagtg 50

- <210> 107
- <211> 50
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> TuMV probe

<400> 107
cgccagcagc ctaacgttga aatagacgtt agcctcagtg aagccgcagc 50

- <210> 108
- <211> 45
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> TuMV probe

<400> 108
cctaggctca aaagcctaac gagcaaatg cgagtgccaa aatac 45

- <210> 109
- <211> 45
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> WMV probe

<400> 109
gaaagtgcc ttatittgcg caatatctct cactgcatga tggag 45

- <210> 110
- <211> 45
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> WMV probe

<400> 110
 tggttgactt tgaattcgca gaatgcttat ttgtgactga tctg 45

<210> 111
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> WMV probe

<400> 111
 ggacgcaggg aaagaatcaa agaaagaaac cagtgacaaa gggaat 46

<210> 112
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> ZYMV probe

<400> 112
 tgatgatctc acatggactc aacattggct atggcaacct agtaaaatcg 50

<210> 113
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> ZYMV probe

<400> 113

ttgactaca caacgaggaa tgtggtgagt tagcagcaac cttttgtcag 50

<210> 114
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> ZYMV probe

<400> 114
 ccagcatctg aggcagaacg catgtatata gcaaaggaag gttattgcta 50

<210> 115
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> ZYMV probe

<400> 115
 cgcctcttgg ttcaaccaag ttcaacaga atacgatctg aatga 45